

血红密孔菌(*Pycnoporus sanguineus* SYBC-L7) 色素的提取及其理化性质

骆守鹏¹, 范晶晶¹, 毛飞君², 蔡宇杰¹, 廖祥儒^{*1}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 金坤生物工程有限公司, 江苏 无锡 214131)

摘要: 研究了一株血红密孔菌(*Pycnoporus sanguineus* SYBC-L7) 固态发酵产色素的提取条件及色素的理化性质。结果表明: 该菌株在以木屑为基质固态发酵时色素产量最高; 以甲醇为提取液, 在 35 °C 水浴下 40 min 后可从发酵后的培养物中最大化提取该色素; 所得色素溶液呈黄色, 在可见光区的最大吸收波长为 430 nm, 该色素的热稳定性和耐酸性较好, 常用的氧化剂与还原剂对其影响不大。

关键词: 色素; 固态发酵; 提取; 稳定性; 血红密孔菌

中图分类号: TS 202.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)11—1163—06

Extraction and Physicochemical Property of Pigment from *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L7

LUO Shou-peng¹, FAN Jing-jing¹, MAO Fei-jun², CAI Yu-jie¹, LIAO Xiang-ru^{*1}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jin Kun Bio-Technology Company, Wuxi 214131, China)

Abstract: The optimum conditions of extracting pigment from the solid state fermentation culture of *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L7 were studied, and the physicochemical properties of this pigment were also analyzed. The results showed that the pigment could be optimum produced by solid-state fermentation with wood chips. Using methanol as the extraction solvent, the pigment could be maximally extracted from the solid culture at 35 °C after 40 min with water bath. The extraction solvent was yellow with a maximum absorption wavelength of 430 nm. The pigment has a good thermal resistance as well as acid resistance, and it cannot be affected by common oxidizing and reducing agents.

Keywords: pigment, solid state fermentation, extraction, stability, *Pycnoporus sanguineus*

收稿日期: 2013-06-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(21176106); 国家 863 计划项目(2010AA101501); 国家重大科技支撑与自主创新专项引导资金项目(BY20101117)。

* 通信作者: 廖祥儒(1964—), 男, 江西南康人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生化与分子生物学方面的研究。

E-mail: liaoxiangru@163.com

随着生活水平和科学技术的发展,色素逐渐进入人们的视野,其不仅广泛应用于食品行业^[1],同时还应用于医药^[2]、化妆品^[3]、印染^[4]等诸多领域以满足人们的需求。通常可将色素分为人工合成色素和天然色素两大类^[5]。近年来发现,相当一部分合成色素存在人体致癌等潜在危害,被禁止使用;相反,天然色素由于其安全可靠,色泽自然鲜艳,且具有很高的营养价值和药理等功能,倍受人们的青睐,有取代合成色素的趋势^[6]。

天然色素来自于动植物材料和微生物,前者由于受到诸多因素,如气候、季节等的影响,原料不足,使其应用受到局限;而利用微生物资源生产天然色素,不仅能克服前者的诸多缺点,并易于工业化^[7],逐渐成为天然色素来源的研究热点。产天然色素的微生物资源十分丰富,已经发现可以产天然色素的微生物,主要包括原核生物、细菌、酵母、真菌、淡水藻类等^[7]。然而,现阶段的产天然色素研究主要集中于实验室规模,真正实现工业化的屈指可数。

真菌作为微生物资源的一种,由于在其生长代谢过程中会合成一定的真菌色素^[8-9],近年来备受研究者关注。根据色素化合物的基本母核差异,可将真菌色素划分为醌类、酸类、酮类和含氮化合物4类^[6],如红曲霉属发酵产生的红曲色素(分为红色和黄色),属聚酮类化合物^[10],而竹黄菌色素主要是萜醌类化合物^[11],这两种色素均可用于食品的着色且具有一定的药理功能。作者利用一株血红密孔菌(*Pycnoporus sanguineus* SYBC-L7)采用木屑、稻草秸秆、麦秸秆、水葫芦和甘蔗渣等农业废弃物固态发酵产色素,并对色素的提取条件及理化性质进行初步研究,探索了该类微生物在资源化利用农业废弃物的应用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 血红密孔菌(*Pycnoporus sanguineus* SYBC-L7)为作者所在实验室保藏。

1.1.2 主要试剂 葡萄糖、酒石酸铵、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、丙酮、乙醇、甲醇等试剂:均为国产分析纯;木屑:购于当地超市;稻草秸秆、麦秸秆、水葫芦和甘蔗渣:均为作者所在实验室提供。

1.1.3 培养基

1)PDA 固体培养基(组分 g/L):去皮土豆 200,

葡萄糖 20,琼脂 20。保藏斜面为 PDA 固体培养基。

2)种子培养基(组分 g/L):葡萄糖 30,蛋白胨 5,酵母膏 10。

3)固态发酵产色素培养基:250 mL 锥形瓶中加入 3 g 木屑(或水葫芦、稻草秸秆、甘蔗渣、麦秸秆),加入 4.5 mL 营养液。营养液配方(g/L):葡萄糖 30,酒石酸铵 15,硫酸铜 0.04,磷酸二氢钾 1,硫酸镁 0.5,磷酸氢二钠 0.2,硫酸锰 0.034。种子培养基灭菌条件为 115 °C 灭菌 20 min;而其他所有培养基为 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 固态发酵产色素 用无菌生理盐水将 *P. sanguineus* SYBC-L7 在 30 °C 下培养 7 d 的 PDA 平板洗涤,过滤之后即为孢子液。将孢子液接种到种子培养基(50 mL/250 mL 三角瓶),30 °C 下旋转式摇床 200 r/min 培养 24 h,接种 5 mL 种子液至固态发酵培养基中,在 30 °C 恒温培养箱中培养 12 d。发酵结束后,将培养基于 60 °C 下烘干至恒重并放入干燥器内待用。

1.2.2 色素提取条件的研究

1)色素提取溶剂的选择及测定条件的确定:取发酵干基 0.2 g,加入 20 mL 甲醇,在 20 °C、100 r/min 的水浴振荡器中浸泡 1 h,过滤并定容至 25 mL,进行波长扫描,确定所存在的吸收峰。分别选择甲醇、乙醇、石油醚(30~60 °C)、异丙醇、异丁醇,提取色素,在最大吸收波长下检测提取液吸光值,确定最适提取溶剂。

2)提取温度对色素提取的影响:取发酵干基 0.2 g,加入 20 mL 甲醇,分别置于不同温度的水浴振荡器中,100 r/min 下浸泡 1 h,取出过滤并定容至 25 mL,在 430 nm 处测定吸光值。

3)提取转速对色素提取的影响:取发酵干基 0.2 g,加入 20 mL 甲醇,置于 35 °C 水浴振荡器中,设定不同的转速,浸泡 1 h,取出过滤并定容至 25 mL,在 430 nm 处测定吸光值。

4)提取时间对色素提取的影响:取发酵干基 0.2 g,加入 20 mL 甲醇,置于 35 °C 水浴振荡器中,分别浸泡 20、40、60、80、100、120 min,过滤并定容至 25 mL,在 430 nm 处测定吸光值。

5)提取料液比对色素提取的影响:取发酵干基 0.2 g,加入不同体积的甲醇(10、15、20、25、30 mL),并置于 35 °C 水浴振荡器中,提取 40 min,过滤后测

定样品提取液的体积 V 及其在 430 nm 处吸光值 A , 并按照公式(1)计算总吸光度 ΣA 。

$$\Sigma A = V \times A \quad (1)$$

1.2.3 色素的理化性质

1) 色素的显色反应: 对色素提取液进行不同的化学试剂处理, 观察色素溶液颜色变化。取 3 mL 色素提取液, 分别加入 0.1 mL 质量分数 1% 的硝酸铝、醋酸铅、氯化钴、氯化亚铁、硼酸、氢氧化钠、氨水, 混合放置 10 min 观察颜色变化。

2) 色素稳定性研究

热稳定性: 取 5 mL 色素提取液, 分别置于 20、30、40、50、60、70 °C 的水浴锅中加热 2 h, 冷却至室温后测定 430 nm 处吸光值。

pH 稳定性: 取 5 mL 色素提取液, 用 1 mol/L 的 HCl 或 NaOH 调节其 pH 值为 1、3、5、7、9、11、13, 放置 30 min 后测定 430 nm 处吸光值并观察颜色变化。

氧化剂与还原剂的影响: 配制不同浓度梯度的 NaHSO_3 、 H_2O_2 、维生素 C、 K_2CrO_7 溶液, 分别取 0.5 mL 加入到 2.5 mL 色素提取液中, 放置 30 min 后测定 430 nm 处吸光值并观察颜色变化。

的生长。在甘蔗渣中, 菌株生长良好但仅有少量色素产生; 而在麦秸秆和木屑中菌丝生长较好, 均明显有色素产生, 且后者产量高于前者, 因此后期将选择木屑作为发酵固体的介质, 进一步优化其发酵条件。

菌株 *P. sanguineus* SYBC-L7 在木屑的固态基质下生长较好, 且在培养过程中培养物表面有一类橘红色物质产生, 见图 1a。将甲醇加入到烘干的固态培养物中, 可较好地提取其中橘红色色素, 所得溶液呈黄色, 见图 1b。

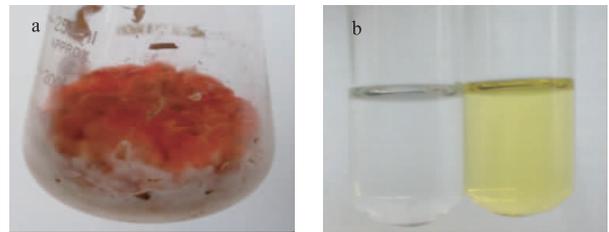


图 1 菌株 *P. sanguineus* SYBC-L7 在固态基质下产色素及色素甲醇提取液

Fig. 1 Pigment produced by *P. sanguineus* SYBC-L7 in solid state fermentation and its methanol extraction solution

图 2 为色素提取液的波长扫描图谱, 从图 2 可知, 发酵后提取液在可见光区存在明显的吸收峰, 波长范围为 430~450 nm, 该结果与图 1b 结果相吻合; 且其最大吸收波长为 430 nm, 因此选取 430 nm 作为后期检测该色素的波长。

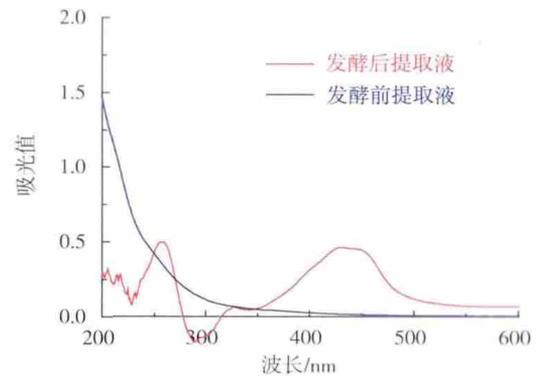


图 2 色素提取液波长扫描图谱

Fig. 2 Wavelength scanning of methanol extraction

2 结果与讨论

2.1 固态发酵产色素及色素的提取

为了探究菌株 *P. sanguineus* SYBC-L7 在不同农业废弃物固态发酵时生长和产色素的情况, 选择稻草秸秆、麦秸秆、水葫芦、甘蔗渣和木屑 5 种废弃物作为固态基质进行发酵, 结果见表 1。

表 1 *P. sanguineus* SYBC-L7 在不同基质下的生长和产色素情况

Table 1 Growth and pigment production by *P. sanguineus* SYBC-L7 in different solid substrate

固体基质	菌丝生长情况	色素产生情况
木屑	良好	有
甘蔗渣	良好	略有
水葫芦	较差	无
稻草秸秆	较差	无
麦秸秆	良好	有

实验中观察菌株菌丝的生长情况, 发现菌株在水葫芦和稻草秸秆下, 菌株生长缓慢, 这可能是因为水葫芦和稻草中营养物质较少, 进而影响了菌株

2.2 色素的提取的优化

2.2.1 提取溶剂的选择 表 2 为不同溶剂提取固体发酵基质后的色素提取液在 430 nm 处吸光值。

可知,使用石油醚(30~60 ℃)为提取剂时吸光值低,表明基本无色素被提取,而异丙醇和异丁醇吸光值较小;甲醇提取液吸光值最大,提取能力最好,乙醇次之,因此后续实验选择甲醇作为提取溶剂。

表 2 提取溶剂对色素提取效果的影响

Table 2 Effect of different solvents on the extraction of pigment

提取溶剂	A_{430}
甲醇	0.460
乙醇	0.297
石油醚(30~60 ℃)	0.073
异丙醇	0.119
异丁醇	0.116

2.2.2 提取温度对色素提取的影响 在不同的温度下,色素的溶解度有所差异,最终会影响色素提取效率。图 3 为不同温度下的色素提取结果,在 15~35 ℃范围内,随着温度的增加,色素吸光值明显增加,且在 35 ℃达到最高值,随后略有所下降。综合考虑节能方面,选择 35 ℃为最适提取温度。

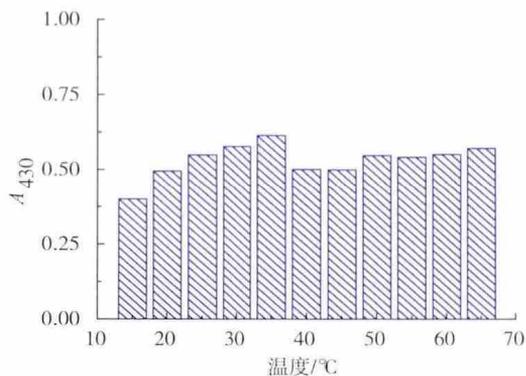


图 3 提取温度对色素提取的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the extraction of pigment

2.2.3 转速对色素提取的影响 从图 4 可以看出,在不同转速下,色素提取液在 430 nm 处吸光值差异不显著,表明转速对于色素提取影响不大。综合考虑,提取转速定为 50 r/min,以便较好的提取色素。

2.2.4 提取时间对色素提取的影响 在色素的提取过程中,提取时间是一个很重要的指标,缩短提取时间能提高提取效率。图 5 为不同提取时间色素提取的结果。可知,提取 40 min 时提取液吸光值最高,且延长提取时间吸光值变化不大,表明在 40 min 时候能够较好的提取色素,因此选 40 min 为最适提取时间。

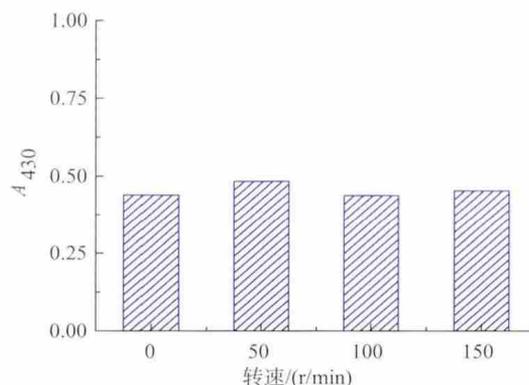


图 4 提取转速对色素提取的影响

Fig. 4 Effect of rotating speed on the extraction of pigment

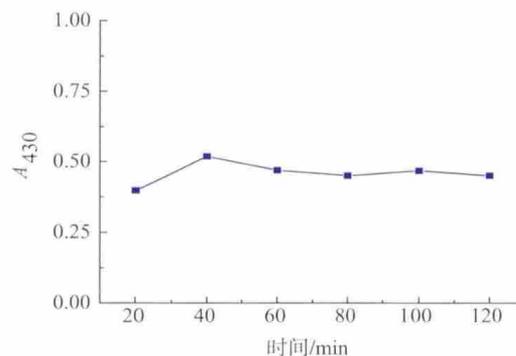


图 5 提取时间对色素提取的影响

Fig. 5 Effect of time on the extraction of pigment

2.2.5 料液比对色素提取的影响 图 6 为不同料液比对色素提取液总吸光值 ΣA 的结果,在 0.2:10 时色素总吸光值较低,而在 0.2:15 时较高;而继续减小料液比时,色素总吸光值变化不明显,因此选择 0.2:15 的料液比进行色素提取。

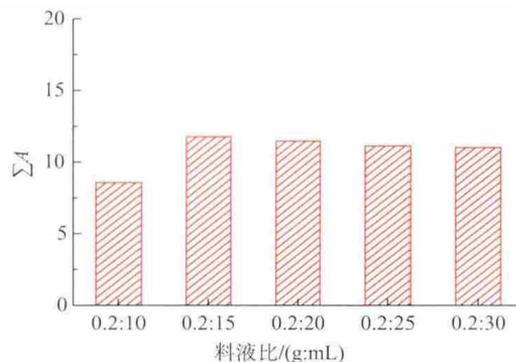


图 6 料液比对色素提取的影响

Fig. 6 Effect of material to liquid ratio on the extraction of pigment

2.3 色素的理化性质

2.3.1 色素提取液的显色反应 由于多数天然产物含有特殊基团,能够在不同的处理溶液条件下呈

现特定的反应变化^[12]。由表 3 可知,醋酸铅溶液处理会产生黄色沉淀,而其他处理均无沉淀产生,可能是由于色素化合物含有羟基和羰基结构,能与醋酸铅形成络合物;氢氧化钠和氨水处理后,提取液颜色变成浅土色,可能是由于溶液的 pH 值呈碱性导致。

表 3 化合物处理对色素颜色的影响

Table 3 Effect of chemical compound on the pigment

化合物		色素提取液	
名称	水溶液颜色	颜色变化	沉淀情况
醋酸铅	无色	黄色	黄色沉淀
硝酸铝	无色	黄色	无沉淀
氯化亚铁	黄色	黄色加深	无沉淀
氯化钴	无色	黄色	无沉淀
硼酸	无色	黄色	无沉淀
氢氧化钠	无色	浅土色	无沉淀
氨水	无色	浅土色	无沉淀

2.3.2 温度对色素稳定性的影响 从图 7 可知,在 20~60 °C 范围内,吸光值无明显变化,表明该色素在所选择的温度范围内稳定性较好,具有较强的耐热性。

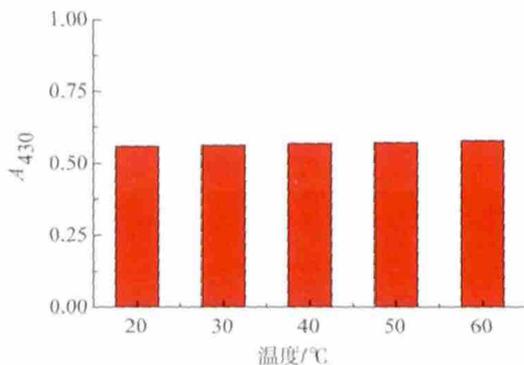


图 7 温度对色素稳定性的影响

Fig. 7 Effect of temperature on stability of pigment

2.3.3 pH 对色素稳定性的影响 pH 值对天然色素的影响主要是使天然色素的结构或组成发生变化,从而使其颜色产生变化^[13]。色素提取液的 pH 稳定性结果见表 4。由表 4 可知,色素在酸性条件下较为稳定,呈黄色;而当 pH 为碱性时,色素吸光值降低,且颜色逐渐变浅,呈黄灰色。

2.3.4 氧化剂与还原剂对色素稳定性的影响 由图 8 可知,加入不同浓度的 NaHSO₃、H₂O₂ 溶液的吸光度没有明显的变化,且溶液颜色基本无变化;而加入 VC 之后,溶液的吸光值有所下降,且溶液的颜色逐渐变浅,可能是因为色素能与 VC 发生某种反应,从而导致溶液颜色变浅且吸光值下降。但

K₂CrO₇ 加入之后,溶液迅速变色且出现红色沉淀,这可能是因 K₂CrO₇ 氧化性太强,色素直接被氧化形成沉淀。

表 4 pH 值对色素稳定性的影响

Table 4 Effect of pH on stability of pigment

pH 值	A ₄₃₀	提取液颜色
1	0.470±0.042	黄色
3	0.468±0.033	黄色
5	0.439±0.029	黄色
7	0.433±0.039	黄色
9	0.395±0.022	浅黄色
11	0.328±0.028	浅黄色
13	0.264±0.031	黄灰色

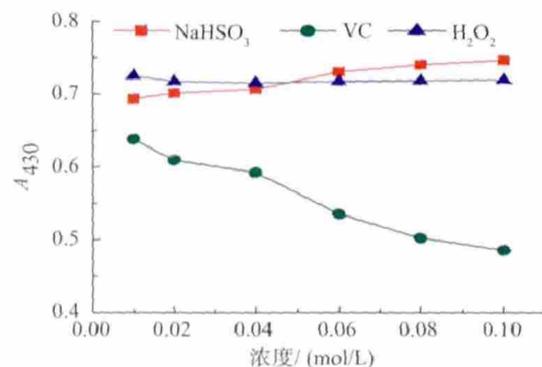


图 8 氧化剂与还原剂的浓度对色素的影响

Fig. 8 Effect of oxidizer and reducing agents on pigment stability

3 结语

通过微生物发酵技术,可将农业固体废弃物作为发酵培养基原料,在合理处置农业固体废弃物的同时,也可产生一些高附加值的生物活性物质如生物酶、天然色素等。血红密孔菌是自然界中广泛存在的一类白腐真菌,其在生长过程中会产生一类红色的色素,有报道称血红密孔菌的色素具有一定的抑制细菌生长的作用^[14],可作为功能性的天然色素使用,因此研究这类真菌发酵产色素的条件及色素的提取条件和色素的理化性质具有一定的理论和应用价值。

作者研究了血红密孔菌 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L7 固态发酵产色素的条件,发现菌株在木屑固态培养下菌株产色素较好。在 35 °C 水浴条件下,使用甲醇浸泡 40 min 可较好的提取固体发酵后的

色素;同时,该色素具有较好的热稳定性和耐酸性,常用的氧化剂与还原剂对其影响不大,初步认定其作为一种稳定性较好的天然色素。后续实验将重点研

究色素的分离纯化条件,确定色素的组成成分、分子组成、分子结构等,以进一步了解血红密孔菌色素的性质,从而实现其产业化应用。

参考文献:

- [1] 成黎. 天然食用色素的特性、应用、安全性评价及安全控制[J]. 食品科学, 2012, 33(23): 399-404.
CHENG Li. Characteristics, application, safety evaluation and safety control of natural food pigments [J]. **Food Science**, 2012, 33(23): 399-404. (in Chinese)
- [2] 杨新河, 吕帮玉, 毛清黎, 等. 茶色素的生物活性研究进展[J]. 江西农业学报, 2012, 24(1): 102-105.
YANG Xin-he, LU Bang-yu, MAO Qing-li, et al. Research progress in biological activity of tea pigments[J]. **Acta Agriculturae Jiangxi**, 2012, 24(1): 102-105. (in Chinese)
- [3] 侯拥钺, 王建华. 天然色素的开发应用[J]. 中国药业, 2009, 18(7): 1-4.
HOU Yong-mang, WANG Jian-hua. Exploitation and application of natural pigment [J]. **China Pharmaceuticals**, 2009, 18(7): 1-4. (in Chinese)
- [4] 沈国强, 杨春霞, 张栋. 天然色素(染料)的研究及发展趋势[J]. 染料与染色, 2009, 46(1): 7-10.
SHEN Guo-qiang, YANG Chun-xia, ZHANG Dong. Research and development of nature colorant (Dyestuff)[J]. **Dyestuffs and Coloration**, 2009, 46(1): 7-10. (in Chinese)
- [5] 李昌伟, 蔡宇杰, 廖祥儒, 等. 镰刀霉菌(*Fusarium sp*)JN158 紫色素的提取及理化性质[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(1): 0138-0144.
LI Chang-wei, CAI Yu-jie, LIAO Xiang-ru, et al. Study on extraction and the physicochemical property of purple pigment from *Fusarium sp*. JN158[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(1): 138-144. (in Chinese)
- [6] 竺立峰, 图力古尔. 大型真菌色素的研究现状与应用前景[J]. 菌物研究, 2005, 3(4): 57.
ZAN Li-feng, BAU Tolgor. Present situations of researches on macrofungal pigments and their application prospects [J]. **Journal of Fungal Research**, 2005, 3(4): 57-62. (in Chinese)
- [7] 王君, 张宝善. 微生物生产天然色素的研究进展[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 580-584.
WANG Jun, ZHANG Bao-shan. Research progress on natural pigments produced by microorganism [J]. **Microbiology China**, 2007, 34(3): 580-584. (in Chinese)
- [8] Jan Velíšek K C. Pigments of higher fungi: A review[J]. **Czech Journal Food Sciences**, 2011, 29(2): 87.
- [9] Gill M. Pigments of fungi(*Macromycete*) [J]. **Natural Products Report**, 2003, 20(615-639): 615.
- [10] 王金字, 董文宾, 杨春红, 等. 红曲色素的研究及应用新进展[J]. 食品科技, 2010, 35(1): 245-248.
WANG Jin-zi, DONG Wen-bin, YANG Chun-hong, et al. The new research and application progress of *Monascus* pigments[J]. **Food Science and Technology**, 2010, 35(1): 245-248. (in Chinese)
- [11] 韩钱松, 沈健增, 蔡宇杰, 等. 维生素对竹黄菌发酵产蒽醌类色素的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(2): 119-123.
HAN Qian-song, SHEN Jian-zeng, CAI Yu-jie, et al. Effect of vitamins on perylenequinones production of *Shiraia bambusicola* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(2): 119-123. (in Chinese)
- [12] 张培成. 黄酮化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 350-400.
- [13] 植中强, 李红纓, 杨海贵. 天然食用色素提取工艺与稳定性研究的状况[J]. 广州化工, 1999, 27(4): 18-20.
ZHI Zhong-qiang, LI Hong-ying, YANG Hai-gui. Research progress on extraction and stability of natural food pigments[J]. **Guangzhou Chemical Industry**, 1999, 27(4): 18-20. (in Chinese)
- [14] A Smania F D M, E F A Smania, M L Gil, et al. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr.[J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 1995, 45(3): 177-181.